

15.12.03

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

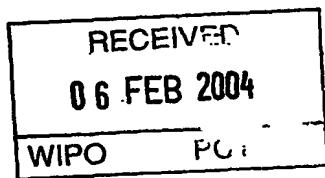
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年11月10日

出願番号  
Application Number: 特願2003-379280

[ST. 10/C]: [JP2003-379280]

出願人  
Applicant(s): 三井化学株式会社

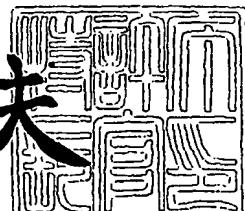


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 1月23日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願  
【整理番号】 P0002692  
【提出日】 平成15年11月10日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N 9/88  
C12N 1/21  
C12N 15/09

【発明者】  
【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷1144 三井化学株式会社内  
【氏名】 八巻 俊文

【発明者】  
【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷1144 三井化学株式会社内  
【氏名】 及川 利洋

【発明者】  
【住所又は居所】 千葉県袖ヶ浦市長浦580番地32 三井化学株式会社内  
【氏名】 田中 英司

【発明者】  
【住所又は居所】 千葉県袖ヶ浦市長浦580番地32 三井化学株式会社内  
【氏名】 伊藤 潔

【発明者】  
【住所又は居所】 千葉県茂原市東郷1144 三井化学株式会社内  
【氏名】 小林 英樹

【特許出願人】  
【識別番号】 000005887  
【氏名又は名称】 三井化学株式会社  
【代表者】 中西 宏幸

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 005278  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項1】

ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(a) 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列を、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列及び配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列とアラインメントする、

(b) アラインメント結果から、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列中の36番目スレオニンより48番目アスパラギンに至る領域、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列中の31番目リジンより51番目フェニルアラニンに至る領域、及び112番目リジンより127番目ロイシンに至る領域に相当するアミノ酸残基を特定する、

(c) 特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う。

## 【請求項2】

ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(d) 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列を、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列及び配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列とアラインメントする、

(e) アラインメント結果から、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列中の36・71・148・204番目に相当するアミノ酸残基、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列中の10・32・33・37・40・41・46・48・51・61・72・112・118・127・146・150・160・168・171・176・186・217・218番目に相当するアミノ酸残基を特定する、

(f) 特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う。

## 【請求項3】

ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(g) 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の立体構造を、PDB (Protein Data Bank) 番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造と、アミノ酸配列に基づいたアラインメントを行う事により推定する、

(h) 推定された立体構造に基づき、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造中のA鎖 (Chain 1IRE:A) におけるN末から数えて2番目のヘリックス、及びB鎖 (Chain 1IRE:B) におけるN末から数えて1番目のヘリックス、2番目のヘリックス、及びそれらにはさまれたループ部分とC末から数えて3番目のヘリックスに相当する領域のアミノ酸残基を特定する、

(i) 特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う。

## 【請求項4】

ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(j) 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の立体構造を、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造と、アミノ酸配列に基づいたアラインメントを行う事により推定する、

(k) 推定された立体構造に基づき、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造中のA鎖におけるN末から89番目のアミノ酸残基であるグルタミン、165番目のアミノ酸残基であるグルタミン酸に相当するアミノ酸残基、及びB鎖のN末から37番目のアミノ酸残基であるフェニルアラニン、48番目のアミノ酸であるロイシンに相当する4つのアミノ酸残基を特定する、

(l) 特定された4つのアミノ酸残基の側鎖先端重原子を各々中心点とした立体構造上半径5Å内の範囲に側鎖先端重原子が含まれるアミノ酸残基を特定する、

(m) 上記1で特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う。  
【請求項5】

ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・Vm<sub>ax</sub>・Km・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(n) 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の立体構造を、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造と、アミノ酸配列に基づいたアラインメントを行う事により推定する、

(o) 推定された立体構造に基づき、基質が酵素外部から活性中心に向かう際や生成物が活性中心から酵素外部に向かう際に通過する空洞を形成する領域を特定する、

(p) 特定された領域を構成するアミノ酸残基の内、それを変更する事が空洞の大きさを変化させ、延いては基質／生成物の通過し易さ／し難さを制御するアミノ酸残基を特定する、

(q) 上記pで特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う。  
【請求項6】

ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・Vm<sub>ax</sub>・Km・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(r) 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の立体構造を、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造と、アミノ酸配列に基づいたアラインメントを行う事により推定する、

(s) 推定された立体構造に基づき、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造中のA鎖におけるN末から89番目のアミノ酸であるグルタミン(A89Q)、165番目のアミノ酸であるグルタミン酸(A165E)に相当するアミノ酸残基、及びB鎖のN末から37番目のアミノ酸であるフェニルアラニン(B37F)、48番目のアミノ酸であるロイシン(B48L)に相当するアミノ酸残基の4つのアミノ酸残基を特定する、

(t) A165Eに相当するアミノ酸残基とB48Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd1、A89Qに相当するアミノ酸残基とB48Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd2、B37Fに相当するアミノ酸残基とB48Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd3と規定し、d1から3の1つ以上を変化させるアミノ酸残基を特定する、

(u) 特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う。  
【請求項7】

(t) の工程が以下の(t')のとおりである請求項6に記載の改変方法、

(t') A165Eに相当するアミノ酸残基とB48Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd1、A89Qに相当するアミノ酸残基とB48Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd2、B37Fに相当するアミノ酸残基とB48Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd3、A165Eに相当するアミノ酸残基とB37Fに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd4、A89Qに相当するアミノ酸残基とB37Fに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd5と規定し、d1から5

の1つ以上を変化させるアミノ酸残基を特定する。

【請求項8】

改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素が下記の[A]と[B]の2種類のポリペプチドを含む事を特徴とする請求項1から7の何れか一項記載の改変方法、

[A] 配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列と40%以上の相同性を示すアミノ酸配列から成るポリペプチド、

[B] 配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列と25%以上の相同性を示すアミノ酸配列から成るポリペプチド。

【請求項9】

[A] のポリペプチドが下記[C]のポリペプチドであり、[B]のポリペプチドが下記[D]ポリペプチドである事を特徴とする請求項8記載の改変方法、

[C] 配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列の少なくとも1箇所に関して置換、挿入又は削除を行ったアミノ酸配列、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列の6・19・38・77・90・102・106・126・130・142・146・187・194・203番目のアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列、の何れかのアミノ酸配列から成るポリペプチド、

[D] 配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列の少なくとも1箇所に関して置換、挿入又は削除を行ったアミノ酸配列、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列の20・21・108・200・212番目のアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列、の何れかのアミノ酸配列から成るポリペプチド。

【請求項10】

[A] のポリペプチドが下記[E]のポリペプチドであり、[B]のポリペプチドが下記[F]のポリペプチドである事を特徴とする請求項8記載の改変方法、

[E] 配列表の配列番号7記載の塩基配列の704番目から1315番目によって成るORF(オープンリーディングフレーム)がコードするアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列から成るポリペプチド、

[F] 配列表の配列番号7記載の塩基配列の1番目から680番目によって成るORFがコードするアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列から成るポリペプチド。

【請求項11】

改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素が構成要素として含む2種のポリペプチドの内、1つが請求項10記載の[E]のポリペプチドであり、もう1つのロリペプチドが請求項10記載の[F]のポリペプチドである事を特徴とし、且つ以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行うことにより、該酵素の活性、基質特異性、V<sub>max</sub>、K<sub>m</sub>、熱安定性、基質に対する安定性、生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(d') 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列を、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列とアラインメントする、

(e') アラインメント結果から、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列中の48・51番目に相当するアミノ酸残基を特定する、

(f') 特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う。

【請求項12】

[A] のポリペプチドが下記[G]のポリペプチドである事を特徴とする請求項8記載の改変方法、

[G] アミノ酸配列X<sub>1</sub> CXLC<sub>1</sub> SC<sub>2</sub> X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> X<sub>5</sub>で表される領域を含むポリペプチド

(ここにおいて、Cはシステインを、Xはセリン又はスレオニンを、Lはロイシンを、C<sub>1</sub>はシステインスルフィン酸(CYSTEINE SULFINIC ACID・3-SULFINOALANINE)を、Sはセリンを、C<sub>2</sub>はシステインスルフェン酸(CYSTEINE SULFENIC ACID・S-HYDROXY-CYSTEINE

) を、  $X_1 \cdot X_2 \cdot X_3 \cdot X_4 \cdot X_5$  は任意のアミノ酸を示す。)。

【請求項13】

$X_1$  がバリン、  $X_4$  がトリプトファン、  $X_5$  がプロリンである事を特徴とする請求項12記載の改変方法。

【請求項14】

$X_2$  がチロシン、  $X_3$  がプロリンである事を特徴とする請求項13記載の改変方法。

【請求項15】

$X_1 \text{ C } X_2 \text{ L } C_1 \text{ S } C_2 \text{ X}_2 \text{ X}_3 \text{ X}_4 \text{ X}_5$  で表される領域を介して金属原子と結合している事を特徴とする請求項12から14の何れか一項記載の改変方法。

【請求項16】

金属原子がコバルト原子である事を特徴とする請求項15記載の改変方法。

【請求項17】

請求項1から16の何れか一項記載の改変方法により得られる事を特徴とする改変酵素。

【請求項18】

請求項17記載の改変酵素をコードする遺伝子。

【請求項19】

請求項18記載の遺伝子を含む事を特徴とするプラスミド。

【請求項20】

微生物を請求項18記載の遺伝子又は請求項19記載のプラスミドを用いる形質転換をすることにより得られる事を特徴とする形質転換体。

【請求項21】

請求項20記載の形質転換体を培養して得られる培養液、細胞、又はそれらの処理物から改変酵素を回収する工程を含む事を特徴とする改変酵素の調製方法。

【請求項22】

請求項20記載の形質転換体を培養して得られる培養液、細胞、又はそれらの処理物、又は請求項21記載の調製方法により得られる改変酵素をニトリル化合物と溶媒中で接触させる事により該ニトリル化合物を対応するアミド化合物へと転化させる工程を含む事を特徴とするアミド化合物製造方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の改変方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の性質を改変する方法に関するものである。また、本発明は性質が改変された酵素、及びそれをコードする遺伝子、該遺伝子を含有するプラスミド、該プラスミドにより形質転換された細胞株、該細胞株を用いてニトリルヒドラターゼを产生する方法、及び該細胞株を培養して得られる培養液・細胞・細胞処理物を用いてニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する方法に関する。本発明は、生体触媒を用いた物質生産の分野に於いて有用である。

【背景技術】

【0002】

種々の化合物のニトリル基を水和によりアミド基に変換するニトリル水和活性を有する酵素であるニトリルヒドラターゼが発見され、該酵素を產生する微生物株が多数開示されている。ニトリルヒドラターゼを用いてニトリル化合物よりアミド化合物を工業的に製造するためには、アミド化合物の製造コストに占める該酵素の製造コストを下げることが重要である。具体的には、酵素調製物の単位重量あたりの該酵素含有量を高くする必要がある。そこで、該酵素の遺伝子を用いて遺伝子工学の手法により該酵素を大量に発現させることを目的として、該酵素の遺伝子をクローニングする試みがなされている。

【0003】

ニトリルヒドラターゼ活性を有する微生物としては、ロドコッカス ロドクロウス J-1 株（ブタペスト条約に則って、受託番号 FERM BP-1478 として茨城県つくば市東一丁目一番一号 中央第6の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。）やシュードノカルディア サーモフィラ（本菌株は、理化学研究所微生物系統保存施設（埼玉県和光市広沢2-1）に番号 JCM3095 として保管され、何人にも請求により自由に分譲される。また、ブタペスト条約に則って、受託番号 FERM BP-7379 として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。）が見い出されている。また、これらの株よりニトリルヒドラターゼが単離され、同酵素が  $\alpha$  サブユニット及び  $\beta$  サブユニットを構成要素としている事が確認されている。そして、これらの株よりニトリルヒドラターゼ遺伝子が単離され、そのアミノ酸配列及び塩基配列が明らかにされた。更に、これらのニトリルヒドラターゼを形質転換体内で発現できるプラスミド及び同プラスミドにより形質転換された細胞株（例として TG1/pNHJ10H 及び MT-10822：これらはブタペスト条約に則って、前者は受託番号 FERM BP-2777、後者は受託番号 FERM BP-5785 として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。）が作出された。加えて、これらの細胞株によるニトリルヒドラターゼの生産及び該細胞株又はそれより得られるニトリルヒドラターゼをニトリル化合物と接触させる事による対応するアミド化合物の製造が可能となっている。（特許文献1から3、非特許文献1参照）

また、ニトリルヒドラターゼの立体構造を解析する試みもなされており、その解析結果は、PDB番号 1AHJ、2AHJ、1IRE として公開されている。該酵素は、 $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットが会合した2量体がその基本構造単位となっており、その2量体が更に会合して4量体や8量体、12量体（由来となる生物種によって異なる。）を形成してその活性を発揮している事が明らかとなっている。更に、その活性中心を形成する領域や構造も明らかになっており、活性中心は、反応溶媒に直接接觸する酵素外側に露出した位置ではなく、酵素内部に包埋される様な位置に存在する事が知られている。活性の発揮に必須である金属原子（コバルト原子又は鉄原子：由来となる生物種によって異なる。）の活性中心への配位の様子も知られており、金属原子の配位に伴う現象として、活性中心を形成する領域を成すアミノ酸配列中のシステイン残基が翻訳後酸化を生じる事も明らかになっている。具体的には、 $\alpha$  サブユニットのアミノ酸配列中の  $X_1 C X L C_1 S C_2 X_2 X_3 X_4 X_5$  ( $C$  はシステインを、 $X$  はセリン又はスレオニンを、 $L$  はロイシンを

、C<sub>1</sub>はシステインスルフィン酸 (CYSTEINE SULFINIC ACID・3-SULFINOALANINE) を、Sはセリンを、C<sub>2</sub>はシステインスルフェン酸 (CYSTEINE SULFENIC ACID・S-HYDROXY-CYSTEINE) を、X<sub>1</sub>・X<sub>2</sub>・X<sub>3</sub>・X<sub>4</sub>・X<sub>5</sub>は任意のアミノ酸を示す。) という配列で表される領域が活性中心への金属原子の配位を担う領域とされている。(非特許文献2から4参照)

しかし、ニトリルヒドラターゼ本来の活性は損なう事無く、活性・基質特異性・V<sub>max</sub>・K<sub>m</sub>・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性等の性質を改変する方法に関しては、具体的な手法を開示した発明は未だなされていない。特に、ニトリルヒドラターゼの立体構造に注目し、その構造を変化させる事によって上記の性質を改変する方法に関しては、その試み自体がなされていない。

#### 【0004】

尚、ニトリルヒドラターゼをコードする遺伝子を宿主細胞で発現させて酵素活性のあるニトリルヒドラターゼを生産する場合に該酵素の活性化に関するタンパク質が存在する点が特許文献4に開示されている。

#### 【0005】

【特許文献1】特許第1927162号公報

【特許文献2】特許第3162091号公報

【特許文献3】特許第3380133号公報

【特許文献4】特許第3408737号公報

【非特許文献1】Kobayashi M, Nishiyama M, Nagasawa T, Horinouchi S, Beppu T, Yamada H. Cloning, nucleotide sequence and expression in Escherichia coli of two cobalt-containing nitrile hydratase genes from Rhodococcus rhodochrous J1. Biochim Biophys Acta. 1991 Dec 2;1129(1):23-33.

【非特許文献2】Huang W, Jia J, Cummings J, Nelson M, Schneider G, Lindqvist Y. Crystal structure of nitrile hydratase reveals a novel iron centre in a novel fold. Structure. 1997 May 15;5(5):691-9.

【非特許文献3】Nagashima S, Nakasako M, Dohmae N, Tsujimura M, Takio K, Oda ka M, Yohda M, Kamiya N, Endo I. Novel non-heme iron center of nitrile hydratase with a claw setting of oxygen atoms. Nat Struct Biol. 1998 May;5(5):347-51.

【非特許文献4】Miyanaga, A., Fushinobu, S., Ito, K., and Wakagi, T. Crystal structure of cobalt-containing nitrile hydratase. Biochem. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Nov 16;288(5):1169-74.

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

本発明の目的は、ニトリルヒドラターゼ本来の活性は損なう事無く、活性・基質特異性・V<sub>max</sub>・K<sub>m</sub>・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性等の性質のうちの一つ以上を変化させる事を含む方法に関する具体的な手法を提供する事である。具体的には、ニトリルヒドラターゼの立体構造に変化を及ぼす変異をニトリルヒドラターゼ遺伝子に導入する事によって上記の性質を改変する方法を提供する事である。更に、改変方法によって得られたニトリルヒドラターゼ、該ニトリルヒドラターゼをコードする遺伝子、該遺伝子を含むプラスミド、該遺伝子乃至該プラスミドにより形質転換された細胞株、該細胞株を用いた該ニトリルヒドラターゼの產生方法、及び該細胞株を培養して得られる培養液・細胞・細胞処理物を用いてニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する方法をも提供する事である。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0007】

本発明者らはかかる状況の下、特許文献2、特許文献3に開示されているニトリルヒドラターゼ遺伝子を例として、新規な観点に基づいて変異の対象となる領域を特定し、該領

域を形成するアミノ酸残基に相当するアミノ酸配列中のアミノ酸に、置換、挿入又は削除等

の変更を加える事によってニトリルヒドラターゼの改変方法を実施した。具体的には、非特許文献2から4やPDB番号1AHJ・2AHJ・1IREとして公開されているニトリルヒドラターゼの立体構造を参照し、鋭意解析を実施する事によって、目的に適う変更対象領域を特定した。より具体的には、立体構造の解析により、基質が酵素外部から活性中心に向かう際や生成物が活性中心から酵素外部に向かう際に通過する空洞を形成する領域、及び2量体形成に関与する $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニット間の会合界面や2量体同士の会合に関与する界面を形成する領域を特定した。アミノ酸配列に置換、挿入又は削除等の変更を加える方法としては、特に限定されないが、遺伝子組換えの技法を用いた変異導入法を、その例として挙げる事が出来る。

#### 【0008】

更に、該変更後の該遺伝子の塩基配列を決定し、該遺伝子を含むプラスミド、該遺伝子乃至該プラスミドにより形質転換された細胞株を作製し、該細胞株を用いた該酵素の產生や該細胞株を培養して得られる培養液・細胞・細胞処理物を用いたニトリル化合物からの対応アミド化合物の製造を実施する事によって改変方法がニトリルヒドラターゼの性質にいかなる変化を及ぼしているかを観察した。改変対象となるニトリルヒドラターゼを構成するアミノ酸配列の様々な位置への変更及びそれによって得られた様々な改変酵素に関して鋭意検討を重ねた結果、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は、下記〔1〕から〔22〕に示す通りである。

#### 【0009】

〔1〕 ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・Vm ax・Km・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(a) 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列を、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列及び配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列とアラインメントする、

(b) アラインメント結果から、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列中の36番目スレオニンより48番目アスパラギンに至る領域、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列中の31番目リジンより51番目フェニルアラニンに至る領域、及び112番目リジンより127番目ロイシンに至る領域に相当するアミノ酸残基を特定する、

(c) 特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う、

〔2〕 ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・Vm ax・Km・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(d) 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列を、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列及び配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列とアラインメントする、

(e) アラインメント結果から、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列中の36・71・148・204番目に相当するアミノ酸残基、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列中の10・32・33・37・40・41・46・48・51・61・72・112・118・127・146・150・160・168・171・176・186・217・218番目に相当するアミノ酸残基を特定する、

(f) 特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う、

〔3〕 ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・Vm ax・Km・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(g) 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の立体構造を、PDB (Protein Data Bank) 番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造と、アミノ酸配列に基づいたアラインメントを行う事により推定する、

(h) 推定された立体構造に基づき、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造中のA鎖 (Chain 1IRE:A) におけるN末から数えて2番目のヘリックス、及びB鎖 (Chain 1IRE:B) におけるN末から数えて1番目のヘリックス、2番目のヘリックス、及びそれらにはさまれたループ部分とC末から数えて3番目のヘリックスに相当する領域のアミノ酸残基を特定する、

(i) 特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う、

[4] ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・Vm<sub>ax</sub>・Km・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(j) 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の立体構造を、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造と、アミノ酸配列に基づいたアラインメントを行う事により推定する、

(k) 推定された立体構造に基づき、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造中のA鎖におけるN末から89番目のアミノ酸残基であるグルタミン、165番目のアミノ酸残基であるグルタミン酸に相当するアミノ酸残基、及びB鎖のN末から37番目のアミノ酸残基であるフェニルアラニン、48番目のアミノ酸であるロイシンに相当する4つのアミノ酸残基を特定する、

(l) 特定された4つのアミノ酸残基の側鎖先端重原子を各々中心点とした立体構造上半径5Å内の範囲に側鎖先端重原子が含まれるアミノ酸残基を特定する、

(m) 上記lで特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う、

[5] ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・Vm<sub>ax</sub>・Km・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(n) 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の立体構造を、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造と、アミノ酸配列に基づいたアラインメントを行う事により推定する、

(o) 推定された立体構造に基づき、基質が酵素外部から活性中心に向かう際や生成物が活性中心から酵素外部に向かう際に通過する空洞を形成する領域を特定する、

(p) 特定された領域を構成するアミノ酸残基の内、それを変更する事が空洞の大きさを変化させ、延いては基質／生成物の通過し易さ／し難さを制御するアミノ酸残基を特定する、

(q) 上記pで特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う、

[6] ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・Vm<sub>ax</sub>・Km・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(r) 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の立体構造を、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造と、アミノ酸配列に基づいたアラインメントを行う事により推定する、

(s) 推定された立体構造に基づき、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造中のA鎖におけるN末から89番目のアミノ酸であるグルタミン (A89Q)、165番目のアミノ酸であるグルタミン酸 (A165E) に相当するアミノ酸残基、及びB鎖のN末から37番目のアミノ酸であるフェニルアラニン (B37F)、48番目のアミノ酸であるロイシン (B48L) に相当するアミノ酸残基の4つのアミノ酸残基を特定する、

(t) A165Eに相当するアミノ酸残基とB48Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd1、A89Qに相当するアミノ酸残基とB48Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd2、B37Fに相当するアミノ酸残基とB48Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd3と規定し、d1から3の1つ以上を変化させるアミノ酸残基を特定する。

(u) 特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う、

[7] (t) の工程が以下の(t')のとおりである[6]に記載の改変方法、

(t') A165Eに相当するアミノ酸残基とB48Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd1、A89Qに相当するアミノ酸残基とB48Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd2、B37Fに相当するアミノ酸残基とB48Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd3、A165Eに相当するアミノ酸残基とB37Fに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd4、A89Qに相当するアミノ酸残基とB37Fに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd5と規定し、d1から5の1つ以上を変化させるアミノ酸残基を特定する。

[8] 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素が下記の[A]と[B]の2種類のポリペプチドを含む事を特徴とする[1]から[7]の何れか一項記載の改変方法、

[A] 配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列と40%以上の相同性を示すアミノ酸配列から成るポリペプチド、

[B] 配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列と25%以上の相同性を示すアミノ酸配列から成るポリペプチド、

[9] [A]のポリペプチドが下記[C]のポリペプチドであり、[B]のポリペプチドが下記[D]ポリペプチドである事を特徴とする[8]記載の改変方法、

[C] 配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列の少なくとも1箇所に関して置換、挿入又は削除を行ったアミノ酸配列、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列の6・19・38・77・90・102・106・126・130・142・146・187・194・203番目のアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列、の何れかのアミノ酸配列から成るポリペプチド、

[D] 配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列の少なくとも1箇所に関して置換、挿入又は削除を行ったアミノ酸配列、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列の20・21・108・200・212番目のアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列、の何れかのアミノ酸配列から成るポリペプチド、

[10] [A]のポリペプチドが下記[E]のポリペプチドであり、[B]のポリペプチドが下記[F]のポリペプチドである事を特徴とする[8]記載の改変方法、

[E] 配列表の配列番号7記載の塩基配列の704番目から1315番目によって成るORF(オープンリーディングフレーム)がコードするアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列から成るポリペプチド、

[F] 配列表の配列番号7記載の塩基配列の1番目から680番目によって成るORFがコードするアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列から成るポリペプチド、

[11] 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素が構成要素として含む2種のポリペプチドの内、1つが[10]記載の[E]のポリペプチドであり、もう1つのロリペプチドが[10]記載の[F]のポリペプチドである事を特徴とし、且つ以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行うことにより、該酵素の活性、基質特異性、Vm<sub>ax</sub>、Km、熱安定性、基質に対する安定性、生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(d') 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列を、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列とアラインメントする、

(e') アラインメント結果から、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列中の48・51番目に相当するアミノ酸残基を特定する、

(f') 特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う、

[12] [A] のポリペプチドが下記[G]のポリペプチドである事を特徴とする[8]記載の改変方法、

[G] アミノ酸配列 X<sub>1</sub> C X L C<sub>1</sub> S C<sub>2</sub> X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> X<sub>5</sub> で表される領域を含むポリペプチド

(ここにおいて、Cはシステインを、Xはセリン又はスレオニンを、Lはロイシンを、C<sub>1</sub>はシステインスルフィン酸 (CYSTEINE SULFINIC ACID・3-SULFINOALANINE) を、Sはセリンを、C<sub>2</sub>はシステインスルフェン酸 (CYSTEINE SULFENIC ACID・S-HYDROXY-CYSTEINE) を、X<sub>1</sub>・X<sub>2</sub>・X<sub>3</sub>・X<sub>4</sub>・X<sub>5</sub>は任意のアミノ酸を示す。)、

[13] X<sub>1</sub> がバリン、X<sub>4</sub> がトリプトファン、X<sub>5</sub> がプロリンである事を特徴とする[12]記載の改変方法、

[14] X<sub>2</sub> がチロシン、X<sub>3</sub> がプロリンである事を特徴とする[13]記載の改変方法、

[15] X<sub>1</sub> C X L C<sub>1</sub> S C<sub>2</sub> X<sub>2</sub> X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> X<sub>5</sub> で表される領域を介して金属原子と結合している事を特徴とする[12]から[14]の何れか一項記載の改変方法、

[16] 金属原子がコバルト原子である事を特徴とする[15]記載の改変方法、

[17] [1]から[16]の何れか一項記載の改変方法により得られる事を特徴とする改変酵素、

[18] [17]記載の改変酵素をコードする遺伝子、

[19] [18]記載の遺伝子を含む事を特徴とするプラスミド、

[20] 微生物を[18]記載の遺伝子又は[19]記載のプラスミドを用いる形質転換することにより得られる事を特徴とする形質転換体、

[21] [20]記載の形質転換体を培養して得られる培養液、細胞、又はそれらの処理物から改変酵素を回収する工程を含む事を特徴とする改変酵素の調製方法、

[22] [20]記載の形質転換体を培養して得られる培養液、細胞、又はそれらの処理物、又は[21]記載の調製方法により得られる改変酵素をニトリル化合物と溶媒中で接触させる事により該ニトリル化合物を対応するアミド化合物へと転化させる工程を含む事を特徴とするアミド化合物製造方法、

### 【発明の効果】

#### 【0010】

本発明により、ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の立体構造を変化させる事を特徴とする手法を用いて、改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素を改変する方法が提供される。この方法を用いる改変方法としては、活性・基質特異性・V<sub>max</sub>・K<sub>m</sub>・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性等といった性質のうちの一つ以上が改変される事を特徴とする効果が得られる事がその効果として挙げられる。また本発明により、新規な変異点を有するニトリルヒドラターゼ、該酵素を構成するポリペプチド鎖をコードする遺伝子が提供される。更に、該遺伝子を含むプラスミド、該遺伝子乃至該プラスミドを含む形質転換体、該形質転換体を用いた該酵素の产生方法、及び該形質転換体を用いたニトリル化合物からの対応するアミド化合物の製造方法が提供される。

### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0011】

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明において、ニトリルヒドラターゼ活性とは、ニトリル化合物を対応するアミド化合物に水和する活性を言う。該活性を有する酵素とは、一般的には $\alpha$ サブユニット、 $\beta$ サブユニットと称される2種のポリペプチド鎖を構成要素とする事を特徴とし、ニトリルヒドラターゼ遺伝子とは、これら2種のポリペプチド鎖を形成する事を特徴とする2つのアミノ酸配列乃至それらをコードする事を特徴とする2つのORF（オープンリーディングフレーム）を成す塩基配列を指す。

## 【0012】

本発明における改変方法とは、ニトリルヒドラターゼ本来の活性は損なう事無く、該酵素の活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる目的の下、改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の立体構造を変化させる事を志向する手法であり、その特徴として、立体構造の解析により、基質が酵素外部から活性中心に向かう際や生成物が活性中心から酵素外部に向かう際に通過する空洞を形成する領域、及び2量体形成に関与する $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニット間の会合界面や2量体同士の会合に関与する界面を形成する領域を特定し、該領域に存在するアミノ酸残基に相当するアミノ酸配列中のアミノ酸に、置換、挿入又は削除等の変更を加える工程を含む事が挙げられる。

## 【0013】

シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラターゼ（配列表の配列番号1及び2・特許文献3・非特許文献4・PDB番号：1IRE参照）を例にして具体的に述べると、基質が酵素外部から活性中心に向かう際や生成物が活性中心から酵素外部に向かう際に通過する空洞を形成する領域に存在するアミノ酸残基に相当するのは、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造中のB鎖におけるN末から数えて1番目のヘリックス・2番目のヘリックス・それにはさまれたループ部分に相当する領域を形成するアミノ酸残基、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造中のA鎖におけるN末から89番目のアミノ酸残基であるグルタミン・165番目のアミノ酸残基であるグルタミン酸に相当するアミノ酸残基、及びB鎖のN末から37番目のアミノ酸残基であるフェニルアラニン・48番目のアミノ酸であるロイシンに相当する4つのアミノ酸残基の側鎖先端重原子を各々中心点とした立体構造上半径5Å内の領域に側鎖先端重原子が含まれるアミノ酸残基、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列中の36番目スレオニンより48番目アスパラギンに至る領域、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列中の31番目リジンより51番目フェニルアラニンに至る領域、及び112番目リジンより127番目ロイシンに至る領域に相当するアミノ酸残基、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列中の37・40・41・46・48・51・61・72・112・118・127番目に相当するアミノ酸残基等が挙げられる。

## 【0014】

また、2量体形成に関与する $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニット間の会合界面や2量体同士の会合に関与する界面を形成する領域に存在するアミノ酸残基に相当するのは、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造中のA鎖におけるN末から数えて2番目のヘリックス、B鎖におけるN末から数えて2番目のヘリックス、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列中の36番目スレオニンより48番目アスパラギンに至る領域、配列表の配列番号2記載の112番目リジンより127番目ロイシンに至る領域に相当するアミノ酸残基、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列中の36・71・148・204番目に相当するアミノ酸残基、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列中の10・32・33・112・118・127・146・150・160・168・171・176・186・217・218番目に相当するアミノ酸残基等が挙げられる。

## 【0015】

更に、基質が酵素外部から活性中心に向かう際や生成物が活性中心から酵素外部に向かう際に通過する空洞を形成する領域領域を構成するアミノ酸残基の内、それを変更する事が空洞の大きさを変化させ、延いては基質／生成物の通過し易さ／し難さを制御するアミノ酸残基を特定する方法としては、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造中のA鎖におけるN末から89番目のアミノ酸であるグルタミン(A89Q)、165番目のアミノ酸であるグルタミン酸(A165E)に相当するアミノ酸残基、及びB鎖のN末から37番目のアミノ酸であるフェニルアラニン(B37F)、48番目のアミノ酸であるロイシン(B48L)に相当する4つのアミノ酸残基を特定し、A165EとB48Lとの最短重原子間距離をd1、A89QとB48Lとの最短重原子間距離をd2、B37FとB48Lとの最短重原子間距離をd3、A165EとB37Fとの最短重原子

間距離を d 4、A 8 9 Q と B 3 7 F との最短重原子間距離を d 5 と規定し、d 1 から 5 の 1 つ以上を変化させるアミノ酸残基を特定する、該 d 1 から 3 の 1 つ以上を変化させるアミノ酸残基を特定する等が挙げられる。

#### 【0016】

尚、他の生物種由来のニトリルヒドラターゼ（例えばロドコッカス ロドクロウス J-1 株由来のニトリルヒドラターゼ）をシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095 由来のニトリルヒドラターゼの立体構造やアミノ酸配列とアラインメントし、上記のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基を見出し、相当するアミノ酸配列中のアミノ酸を変更する事による改変方法も本発明に含まれる。

#### 【0017】

以上に列举した内容を実施するに当って、立体構造乃至アミノ酸配列に基づいたアラインメントを行うに際して、それに用いる手段は特に限定されないが、アミノ酸配列のアラインメントの手段としては日立ソフト社製のDNASISやフリーソフトのCLUSTALWやBLAST等の遺伝子配列解析ソフトが、アミノ酸配列のアラインメントに基づく立体構造のモデリングの手段としてはアクセルリス社製のモデラーやホモロジー等の蛋白質立体構造予測ソフトが、各々例として挙げられる。

#### 【0018】

一例を述べると、ロドコッカス ロドクロウス J-1 株由来のニトリルヒドラターゼ（配列表の配列番号 7・特許文献 2・非特許文献 1 参照）の場合、アラインメントの結果、配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列中の 48 番目に相当するアミノ酸残基：Leu に相当するアミノ酸残基は、配列表の配列番号 7 記載の塩基配列の 1 番目から 690 番目によって成る ORF がコードするアミノ酸配列の 48 番目に相当するアミノ酸残基：Trp であり、配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列中の 51 番目に相当するアミノ酸残基：Phe に相当するアミノ酸残基は、配列表の配列番号 7 記載の塩基配列の 1 番目から 690 番目によって成る ORF がコードするアミノ酸配列の 51 番目に相当するアミノ酸残基：Ser である。これは、アミノ酸配列に基づいたアラインメントと立体構造に基づいたアラインメントとで一致する結果である。この 2 つのアミノ酸残基に相当するアミノ酸配列中のアミノ酸の何れか一方又は両方を変更する事による改変方法も本発明に含まれる。

#### 【0019】

尚、以上の改変方法を実施するに当って、アミノ酸残基に相当するアミノ酸配列中のアミノ酸を変更する為の変異導入手段に関しては、特に限定されないが、遺伝子組換えの技法を用いてアミノ酸配列中のアミノ酸を他のアミノ酸に置換する変異導入法を、その例として挙げる事が出来る。

#### 【0020】

また、意図して導入した変異以外に副次的に導入される変異によるアミノ酸配列や塩基配列の変化については、意図した変異導入による目的のニトリルヒドラターゼ活性を損なわない範囲内で、アミノ酸や塩基の置換、挿入又は削除が生じてもよい。

#### 【0021】

この様な副次的に導入される変異については以下の様な例を挙げる事が出来る。ある一定の塩基配列を有する遺伝子を鋳型として転写・翻訳された場合であっても、それを導入する宿主細胞の種類や培養に使用する栄養培地の成分や組成又は培養時の温度や pH 等によつては、遺伝子発現後の宿主細胞内酵素による修飾などにより、初期の酵素作用は保持しているものの配列表における N 末端付近のアミノ酸の 1 個又は 2 個以上が欠失したり、N 末端に 1 個又は 2 個以上のアミノ酸が新たに付加した異型体を產生する事があり得る。その為、そのような異型なニトリルヒドラターゼをもたらす改変方法も本発明に含まれる。

#### 【0022】

本発明における改変方法の対象となる、改変前のニトリルヒドラターゼの例としては、ロドコッカス ロドクロウス J-1 株由来のニトリルヒドラターゼとシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095 由来のニトリルヒドラターゼとを挙げる事が出来る。具

体的には、配列表の配列番号 7 記載の塩基配列の 1 番目から 690 番目によって成る ORF がコードするアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列によって形成されるポリペプチド鎖と配列表の配列番号 7 記載の塩基配列の 704 番目から 1315 番目によって成る ORF がコードするアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列によって形成されるポリペプチド鎖とを構成要素とするニトリルヒドラターゼと、配列表の配列番号 1 記載のアミノ酸配列によって形成されるポリペプチド鎖と配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列によって形成されるポリペプチド鎖と構成要素とするニトリルヒドラターゼと、を挙げる事が出来る。

#### 【0023】

本発明における改変方法の対象となる、改変前のニトリルヒドラターゼには、配列表の配列番号 1 記載のアミノ酸配列と 40% 以上の相同性を示すアミノ酸配列から成るポリペプチドと配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列と 25% 以上の相同性を示すアミノ酸配列から成るポリペプチドとを構成要素とするニトリルヒドラターゼも含まれる。

#### 【0024】

配列表の配列番号 1 記載のアミノ酸配列と 40% 以上の相同性を示すアミノ酸配列から成るポリペプチドの例としては、配列表の配列番号 1 記載のアミノ酸配列から成るポリペプチド、配列表の配列番号 1 記載のアミノ酸配列の少なくとも 1箇所に関して置換、挿入又は削除の何れかの変更を施したアミノ酸配列から成るポリペプチド、配列表の配列番号 1 記載のアミノ酸配列の 6・19・38・77・90・102・106・126・130・142・146・187・194・203 番目のアミノ酸の少なくとも 1 つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列から成るポリペプチド、配列表の配列番号 7 記載の塩基配列の 704 番目から 1315 番目によって成る ORF がコードするアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列から成るポリペプチド等を挙げる事が出来る。

#### 【0025】

また、配列表の配列番号 1 記載のアミノ酸配列と 40% 以上の相同性を示すアミノ酸配列から成るポリペプチドは、その配列中に  $X_1 C X L C_1 S C_2 X_2 X_3 X_4 X_5$  (ここで C はシスティンを、 X はセリン又はスレオニンを、 L はロイシンを、  $C_1$  はシスティンスルフィン酸 (CYSTEINE SULFINIC ACID・3-SULFINOALANINE) を、 S はセリンを、  $C_2$  はシスティンスルフェン酸 (CYSTEINE SULFENIC ACID・S-HYDROXY-CYSTEINE) を、  $X_1 \cdot X_2 \cdot X_3 \cdot X_4 \cdot X_5$  は任意のアミノ酸を示す。) で表される領域を含むポリペプチドである事を特徴とする場合がある。加えて、  $X_1$  がバリン、  $X_4$  がトリプトファン、  $X_5$  がプロリンであるポリペプチドである事を特徴とする場合がある。更に加えて、  $X_2$  がチロシン、  $X_3$  がプロリンであるポリペプチドである事を特徴とする場合がある。

#### 【0026】

上記の場合、  $X_1 C X L C_1 S C_2 X_2 X_3 X_4 X_5$  で表される領域を介して金属原子と結合している事を特徴とする場合がある。加えて、該金属がコバルトである事を特徴とする場合がある。

#### 【0027】

配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列と 25% 以上の相同性を示すアミノ酸配列から成るポリペプチドの例としては、配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列から成るポリペプチド、配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列の少なくとも 1 箇所に関して置換、挿入又は削除の何れかの変更を施したアミノ酸配列から成るポリペプチド、配列表の配列番号 2 記載のアミノ酸配列の 20・21・108・200・212 番目のアミノ酸の少なくとも 1 つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列から成るポリペプチド、配列表の配列番号 7 記載の塩基配列の 1 番目から 690 番目によって成る ORF がコードするアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列から成るポリペプチド等を挙げる事が出来る。

#### 【0028】

一例を述べると、ロドコッカス ロドクロウス J-1 株由来のニトリルヒドラターゼの場合、配列表の配列表の配列番号 7 記載の塩基配列の 704 番目から 1315 番目によって成る ORF がコードするアミノ酸配列から成るポリペプチドと配列表の配列番号 7 記載

の塩基配列の1番目から690番目によって成るORFがコードするアミノ酸配列から成るポリペプチドとを構成要素とするニトリルヒドラターゼであるので、本発明における改変方法の対象となる、改変前のニトリルヒドラターゼに含まれる。

#### 【0029】

本発明において、改変酵素とは、ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素を対象として改変方法を実施する事によって得られる蛋白質を言う。その例としては、上述の改変方法を用いて改変前のニトリルヒドラターゼの形質を変化させて得られる事を特徴とする改変酵素を、その例として挙げる事が出来る。

#### 【0030】

形質の変化としては、改変前の酵素と比較した場合、基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質（：該酵素が触媒として機能し、対応するアミド化合物に変換する事が可能な任意のニトリル化合物が例として挙げられる。）に対する安定性・生成物（：該酵素が触媒として機能し、任意のニトリル化合物を変換する事で得られる対応するアミド化合物が例として挙げられる。）に対する安定性等といった性質の何れか1つ以上の性質に関する変化を挙げる事が出来る。具体的な例としては、

- 1) 相対的に、より嵩高いニトリル化合物を基質とし易くなる。
- 2) 相対的に、より嵩の小さいニトリル化合物を基質とし易くなる。
- 3) 任意のニトリル化合物を基質とする場合の $V_{max}$ が向上する。
- 4) 任意のニトリル化合物を基質とする場合の $K_m$ が低減する。
- 5) 酵素を任意の熱量に暴露した場合の不可逆的失活率が軽減する。
- 6) 酵素を任意濃度の基質に暴露した場合の不可逆的失活率が軽減する。
- 7) 反応中に任意濃度の生成物が存在する事による反応阻害率が軽減する。
- 8) 酵素を任意濃度の生成物に暴露した場合の不可逆的失活率が軽減する。

等を挙げる事が出来る。

#### 【0031】

ロドコッカス ロドクロウス J-1株由来のニトリルヒドラターゼを対象とした例においては、配列表の配列番号7記載の塩基配列の1番目から690番目によって成るORFがコードするアミノ酸配列の48番目に相当するアミノ酸残基：Trpを他のアミノ酸残基に変更する事による改変方法を実施した場合、改変前の対象と比較して、より嵩高いニトリル化合物を基質とし易くなる形質の変化を示した。従って、獲得した形質変化を示す蛋白質は、本発明における改変酵素に含まれる。

#### 【0032】

本発明において、改変酵素をコードする遺伝子とは、改変酵素を構成する2種のポリペプチド鎖を形成する事を特徴とする2つのアミノ酸配列乃至それらをコードする事を特徴とする2つのORFを成す塩基配列を指す。

#### 【0033】

本発明において、遺伝子を含む事を特徴とするプラスミドとは、改変酵素を構成する2種のポリペプチド鎖を形成する事を特徴とする2つのアミノ酸配列をコードする事を特徴とする2つのORFを成す塩基配列をその配列中に含有する事を特徴とするプラスミドを指す。

#### 【0034】

上記のプラスミドは、本発明における遺伝子に加え、各遺伝子の発現に必要な制御領域及び自律複製に必要な領域等の、任意の宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体や細胞株による改変酵素の産生を可能せしめる構成を有する事が出来る。ここでいう任意の宿主細胞とは、後述の実施例の様にその一例として大腸菌が挙げられるが、これに限定されるのものではなく、枯草菌等のバチルス属菌、酵母や放線菌等の他の微生物も用いる事が出来る。

#### 【0035】

発現に必要な制御領域としては、プロモーター配列（転写を制御するオペレーター配列を含む。）、リボゾーム結合配列（SD配列）、転写終結配列等を挙げる事が出来る。

**【0036】**

具体的なプロモーター配列の例としては、大腸菌由来のトリプトファンオペロンの t r p プロモーター・ラクトースオペロンの lac プロモーター・ラムダファージ由来の P L プロモーター及び P R プロモーターや、枯草菌由来のグルコン酸合成酵素プロモーター (gnt) 、アルカリプロテアーゼプロモーター (apr) 、中性プロテアーゼプロモーター (npr) 、  $\alpha$ -アミラーゼプロモーター (amy) 等が挙げられる。また、 tac プロモーターや trc プロモーターのように人為的に設計・改良された配列も利用出来る。

**【0037】**

リボゾーム結合配列としては、大腸菌由来や枯草菌由来又はロドコッカスやシュードノカルディア本来の配列が挙げられるが、大腸菌や枯草菌等の所望の宿主細胞内で機能する配列であれば特に限定されるものではない。例えば、 16S リボゾーム RNA の 3' 末端領域に相補的な配列が 4 塩基以上連続したコンセンサス配列を DNA 合成により作成してこれを利用してもよい。転写終結配列は必ずしも必要ではないが、  $\rho$  因子非依存性のもの、例えばリポプロテインターミネーター・ trp オペロンターミネーター等が利用出来る。これら制御領域のプラスミド上での配列順序は、プロモーター配列とリボゾーム結合配列は本発明における遺伝子より 5' 末端側上流に位置する事が望ましく、転写終結配列は本発明における遺伝子より 3' 末端側下流に位置する事が望ましい。また、その様な制御領域により本発明における遺伝子を構成する各々の ORF をコードする塩基配列が各々独立のシストロンとして発現されてもよいし、共通の制御領域によりポリシストロンとして発現されてもよい。

**【0038】**

以上の要件を満たしているプラスミドベクターの例としては、大腸菌中での自律複製可能な領域を有している pBR322 、 pUC18 、 pBlue script 、 pKK223-3 、 pSC101 や、枯草菌中での自律複製可能な領域を有している pUB110 、 pTZ4 、 pC194 、  $\rho$ 11 、  $\phi$ 1 、  $\phi$ 105 等を挙げる事が出来る。また、 2 種類以上の宿主細胞内での自律複製が可能なプラスミドベクターの例として、 pHV14 、 TR p7 、 YEp7 、 pBS7 を挙げる事が出来る。

**【0039】**

本発明における遺伝子を発現させて所望の活性を有するニトリルヒドラターゼを生産するに際しては、ニトリルヒドラターゼの活性化に関与する蛋白質をコードする遺伝子が必要となる場合がある。

ニトリルヒドラターゼの活性化に関与する蛋白質とは、該蛋白質の発現の有無が、ニトリルヒドラターゼの活性化を直接左右する性質を有している蛋白質の事であり、特許文献 4 に記載されるシュードノカルディア サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼ活性化に関与する蛋白質（ニトリルヒドラターゼ活性化蛋白質）をその例として挙げる事が出来る。具体的には、ニトリルヒドラターゼ活性化蛋白質としては、配列番号： 5 のアミノ酸配列に示される 144 個のアミノ酸の配列により構成されるものをその例として挙げる事が出来る。また、配列番号： 5 のアミノ酸配列の一部でのアミノ酸の置換、挿入又は削除等により得られた異型蛋白質も、ニトリルヒドラターゼの活性化に関与するものであれば、ニトリルヒドラターゼ活性化蛋白質に含まれるものとする。この異型蛋白質としては、配列番号 5 のアミノ酸配列において 1 個以上のアミノ酸の置換、挿入又は削除等による変異を有し、ニトリルヒドラターゼの活性化に関与する性質を維持しているものを挙げる事が出来る。

**【0040】**

ニトリルヒドラターゼ活性化蛋白質をコードする遺伝子としては、ニトリルヒドラターゼ活性化蛋白質をコードする遺伝子であれば特に限定されるものではない。この遺伝子としては、上記の配列番号： 5 のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子及び上記の異型蛋白質をコードする遺伝子を挙げる事が出来る。更に、このニトリルヒドラターゼ活性化蛋白質をコードする遺伝子の好ましい例としては、配列番号： 6 の塩基配列を有する遺伝子を挙げる事が出来る。更に、ニトリルヒドラターゼ活性化蛋白質をコードする

遺伝子には、配列番号：6に記載の塩基配列配列の1個または2個以上について塩基の置換・挿入・削除が行われた配列であっても、それがニトリルヒドラターゼ活性化蛋白質をコードする遺伝子として機能する場合には、ニトリルヒドラターゼ活性化蛋白質をコードする遺伝子の範囲に含まれるものとする。

#### 【0041】

ニトリルヒドラターゼ活性化蛋白質をコードする遺伝子を用いる場合としては、そのORFを本発明における遺伝子を成す2つのORFと共に、本発明におけるプラスミド中に含める例を挙げる事が出来る。その場合、これらORFのプラスミド上における順序は特に限定されず、また、3つのORFが同一の制御領域により制御されてもよく、2つのORFが同一の制御領域により制御され、残る1つのORFが他の2つとは異なる制御領域により制御されてもよく、3つのORFが各々異なる制御領域により制御されてもよい。

#### 【0042】

この様なベクタープラスミドに本発明における遺伝子を本発明における改変酵素の活性発現に必要な領域と共に挿入して本発明のプラスミドを構築する方法や該プラスミドを所望の宿主細胞に形質転換する方法及び該形質転換体内でニトリルヒドラターゼを產生させる方法には、例えば「Molecular Cloning 3rd Edition」(J. Sambrookら; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)等に記載されている分子生物学・生物工学・遺伝子工学の分野において公知の一般的な方法と宿主細胞が利用出来る。

#### 【0043】

本発明において、形質転換により得られる事を特徴とする形質転換体としては、本発明における遺伝子乃至プラスミドを用いて宿主細胞を形質転換する事により得られたものを含む。該形質転換体を培養する例としては、培養用の培地に植えた後、適当な培養温度（一般的には、20℃～50℃）で生育させる事を特徴とする方法が挙げられる。

#### 【0044】

尚、宿主細胞が微生物の場合、上記の形質転換体を培養する培地としてLB培地やM9培地などが一般的に用いられるが、そのような培地成分に金属イオンを添加しても良い。添加する金属イオンとしては、Feイオン及びCoイオンが挙げられる。また、添加量としては、0.1μg/mL以上の添加が例として挙げられる。

#### 【0045】

本発明において、形質転換体を培養して得られる培養液、細胞、又はそれらの処理物から改変酵素を回収する工程を含む事を特徴とする改変酵素の調製方法としては、上記の形質転換体、該形質転換体の培養液、又は該形質転換体や該培養液の処理物からニトリルヒドラターゼ活性を回収する工程を有する特徴のある例を挙げる事が出来る。

#### 【0046】

本発明において、ニトリル化合物を対応するアミド化合物へと転化させる工程を含む事を特徴とするアミド化合物製造方法としては、上記の形質転換体、該形質転換体の培養液、又は該形質転換体や該培養液の処理物、又は上記調製方法によって回収したニトリルヒドラターゼ活性を触媒として用いて、ニトリル化合物を対応するアミド化合に変換する工程を有する特徴のある例を挙げる事が出来る。

#### 【0047】

本発明における改変酵素又は該酵素活性を有する形質転換体を利用して、ニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する例としては、所望のニトリル化合物を、該酵素精製物や粗酵素調製物、本発明における形質転換体の培養液、培養液から得られる形質転換体、又は形質転換体の処理物と溶媒中で接触させる工程を含む方法が挙げられる。ここでいう処理物とは、該形質転換体からの抽出物や磨碎物、これらの抽出物や磨碎物のニトリルヒドラターゼ活性画分を分離して得られる粗酵素調製物、更に精製して得られる酵素精製物などの後分離物、該形質転換体や該形質転換体の抽出物、磨碎物または後分離物を適当な手段を用いて固定化した固定化物を含む。接触させる温度は特に限定されないが、好ましくは該ニトリルヒドラターゼが失活しない温度範囲内であり、より好ましくは冰点以

上60℃以下である。

**【0048】**

ニトリル化合物としては、本発明の改良酵素が基質として作用できる化合物であれば特に限定されないが、アセトニトリル・プロピオニトリル・アクリロニトリル・メタクリロニトリル・n-ブチロニトリル・イソブチロニトリル・クロトノニトリル・ $\alpha$ -ヒドロキシインプロピロニトリル等といった炭素数2～4のニトリル化合物がその例として挙げられる。該ニトリル化合物の溶媒中の濃度は、特に限定されるものではなく、また、反応温度も特に限定されないが、好ましくは該ニトリルヒドラターゼが失活しない温度範囲内であり、より好ましくは氷点以上50℃以下である。

**【0049】**

以下に記載する実施例によって本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例によって何等限定されるものではない。尚、各実施例及び比較例におけるHPLC分析は、カラムとして日本分光製のFinepack SIL C18-5 (250×4.6φmm) を用い、4体積%のアセトニトリルを含む10mMリン酸水溶液を展開液として使用した。また、アクリルアミド、アクリロニトリル、アクリル酸、メタクリルアミド、メタクリロニトリル、メタクリル酸は210nmの吸光度により検出した。

**【実施例1】**

**【0050】**

ロドコッカス ロドクロウス J-1株からのゲノムDNA調製

500mlのバッフル付三角フラスコに下記の組成の培地100mlを調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。

培地組成：

グルコース：10.0g/L、リン酸二水素一カリウム：0.5g/L、リン酸一水素二カリウム：0.5g/L、硫酸マグネシウム・七水和物：0.5g/L、酵母エキストラクト：1.0g/L、ペプトン：7.5g/L、尿素：7.5g/L、塩化コバルト・六水和物：10.0mg/L、pH 7.2

この培地に特許文献1記載のロドコッカス・ロドクロウスJ-1株 (FERM BP-1478として、前記の寄託機関に特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に基づいて寄託されており、万人に対し請求により分譲される) を一白菌耳植菌し、30℃・130rpmにて72時間培養した。遠心分離(15000G×15分間)により菌体のみを培養液より分離し、続いて、50mlの生理食塩水に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行って湿菌体を得た。

**【0051】**

上記で得た湿菌体2gに0.15MのNaClを含む50mMのEDTA・2Na水溶液(pH 8.0)を40ml加えて菌体を懸濁し、90℃で10分間煮沸処理した。該処理液を37℃まで冷却した後に、卵白リソチームを100mg加えて37℃で1時間保温した。次に20000U/mgのザイモリースを30mg加えて37℃で1時間保温した。続いて20U/mgのプロテイネースKを5mg加えて37℃で1時間保温した。更に、10%SDS溶液を2ml添加して65℃で1時間保温した後、直ちにフェノール／クロロホルム抽出を行った。まず、TE (1mMのEDTA・2Naを含む10mMのトリス塩酸水溶液；pH 8.0) で飽和させたフェノール液42mlを加え緩やかに攪拌した。遠心分離(30000rpm・10分間)により水相と有機相を分離し、水相のみを分取した。この水相に上記のTE飽和フェノール液21mlとクロロホルム21mlを加えて再び緩やかに攪拌した後、遠心分離(30000rpm・10分間)により水相と有機相を再度分離し、水相のみを再分取した。この水相にクロロホルム42mlを加えて再び緩やかに攪拌した後、遠心分離(30000rpm・10分間)により水相と有機相を再度分離し、水相のみを分取した。この水相に1.1MのNaClを含むTE溶液4mlとエタノール92mlを加えてしばらく室温で放置した後、析出した糸状のDNAをガラス棒を用いて巻取った。70%・80%・90%のエタノール水溶液で順次脱水を行った後に風乾させた該DNAを40mlのTE溶液に再溶解させた。RNase Aを30μg加えて

37℃で1時間保温した後、制限酵素BamHIにより部分切断した。フェノール抽出／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって部分切断された該DNAを再精製し、最終的に1.0μg/mlとなるようにTE溶液に溶解させた。

#### 【実施例2】

##### 【0052】

PCRを用いたロドコッカスロドクロウスJ-1株ゲノムDNAからのニトリルヒドラターゼ遺伝子の調製

特許文献2及び非特許文献1において明らかになっているニトリルヒドラターゼ遺伝子の塩基配列に基づいて、配列表の配列番号8及び9記載のプライマーを合成した。実施例1にて調製した部分切断された染色体DNA 3μgを鋳型としてPCRを行った。PCR反応では、各プライマーを各々200ngとKODポリメラーゼ（東洋紡績社製）を1Uを含む全量50μlの系で、熱変性（98℃）15秒・アニーリング（58℃）15秒・伸長反応（68℃）2分間のサイクルを40回繰り返した。PCR反応の終了液をアガロース電気泳動（シグマ社製タイプVII低融点アガロース使用；アガロース濃度0.8重量%）によりDNA增幅産物の分析を行ったところ、約1.3kbの増幅DNA産物の存在が確認できた。

##### 【0053】

続いて、アガロースゲルから約1.3kbのDNA断片のみを切り出し、該アガロース片（約0.1g）を細かく粉碎し1mlのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行った。まず、TE（1mMのEDTA・2Naを含む10mMのトリス塩酸水溶液；pH8.0）で飽和させたフェノール液1mlを加え緩やかに攪拌した。遠心分離（3000rpm・10分間）により水相と有機相を分離し、水相のみを分取した。この操作を3回繰り返した後、得られた水相に上記のTE飽和フェノール液0.4mlとクロロホルム0.4mlを加えて再び緩やかに攪拌した後、遠心分離（3000rpm・10分間）により水相と有機相を再度分離し、水相のみを再分取した。この水相にクロロホルム0.8mlを加えて再び緩やかに攪拌した後、遠心分離（3000rpm・10分間）により水相と有機相を再度分離し、水相のみを分取した。この水相に1.1MのNaClを含むTE溶液80μlとエタノール1.7mlを加えて-80℃で30分間放置した後、遠心分離（15000rpm・20分間・4℃）によりDNA断片の沈殿を回収した。該DNA断片を風乾後、最終的に10μlのTEに溶解した。

##### 【0054】

精製した約1.3kbの増幅DNA断片を制限酵素EcoRI及びScaIにより切断した後、アガロース電気泳動（シグマ社製タイプVII低融点アガロース使用；アガロース濃度0.8重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、約1.3kbのDNAの存在が確認できた。アガロースゲルからこの約1.3kbのDNA断片を切り出し、該アガロース片（約0.1g）を細かく粉碎し1mlのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行った。まず、TE（1mMのEDTA・2Naを含む10mMのトリス塩酸水溶液；pH8.0）で飽和させたフェノール液1mlを加え緩やかに攪拌した。遠心分離（3000rpm・10分間）により水相と有機相を分離し、水相のみを分取した。この操作を3回繰り返した後、得られた水相に上記のTE飽和フェノール液0.4mlとクロロホルム0.4mlを加えて再び緩やかに攪拌した後、遠心分離（3000rpm・10分間）により水相と有機相を再度分離し、水相のみを再分取した。この水相にクロロホルム0.8mlを加えて再び緩やかに攪拌した後、遠心分離（3000rpm・10分間）により水相と有機相を再度分離し、水相のみを分取した。この水相に1.1MのNaClを含むTE溶液80μlとエタノール1.7mlを加えて-80℃で30分間放置した後、遠心分離（15000rpm・20分間・4℃）によりDNA断片の沈殿を回収した。該DNA断片を風乾後、最終的に10μlのTEに溶解した。

#### 【実施例3】

## 【0055】

ロドコッカス ロドクロウス J-1 株由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子を発現させる為のプラスミドベクターの調製

500mLのバッフル付三角フラスコに下記の組成の40 $\mu$ g/mLの硫酸第二鉄・七水和物及び10 $\mu$ g/mLの塩化コバルト・二水和物を含むLB液体培地を100mL調製し、121℃・20分間のオートクレープにより滅菌した。  
培地組成：

酵母エキストラクト：5.0g/L、ポリペプトン：10.0g/L、NaCl：5.0g/L、塩化コバルト・六水和物：10.0mg/L、硫酸第二鉄・七水和物：40.0mg/L、pH 7.5

この培地に終濃度が100 $\mu$ g/mLとなるようにアンピシリンを添加した後、特許文献3記載のMT10822 (FERM BP-5785) を一白菌耳植菌し、37℃・130rpmにて16時間培養した。遠心分離 (15000G×15分間) により菌体のみを培養液より分離し、続いて、50mLの生理食塩水に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行って湿菌体を得た。該湿菌体よりアルカリSDS抽出法によりpPT-DB1 (図1) のプラスミドを調製し、RNase Aを30 $\mu$ g加えて37℃で1時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該DNAを精製し、最終的に1.0 $\mu$ g/ $\mu$ LとなるようにTE溶液に溶解させた。

## 【0056】

精製したプラスミド1 $\mu$ gを制限酵素EcoRI及びEco47IIIにより切断した後、アガロース電気泳動 (シグマ社製タイプVII低融点アガロース使用；アガロース濃度0.8重量%) によりDNA增幅産物の分析を行ったところ、約3.3kbと約1.3kbのDNAの存在が確認できた。アガロースゲルから約3.3kbのDNA断片のみを切り出し、該アガロース片 (約0.1g) を細かく粉碎し1mLのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行った。まず、TE (1mMのEDTA・2Naを含む10mMのトリス塩酸水溶液; pH 8.0) で飽和させたフェノール液1mLを加え緩やかに攪拌した。遠心分離 (3000rpm・10分間) により水相と有機相を分離し、水相のみを分取した。この操作を3回繰り返した後、得られた水相に上記のTE飽和フェノール液0.4mLとクロロホルム0.4mLを加えて再び緩やかに攪拌した後、遠心分離 (3000rpm・10分間) により水相と有機相を再度分離し、水相のみを再分取した。この水相にクロロホルム0.8mLを加えて再び緩やかに攪拌した後、遠心分離 (3000rpm・10分間) により水相と有機相を再度分離し、水相のみを分取した。この水相に1.1MのNaClを含むTE溶液80 $\mu$ Lとエタノール1.7mLを加えて-80℃で30分間放置した後、遠心分離 (15000rpm・20分間・4℃) によりDNA断片の沈殿を回収した。該DNA断片を風乾後、最終的に10 $\mu$ LのTEに溶解した。

## 【実施例4】

## 【0057】

ロドコッカス ロドクロウス J-1 株由来のニトリルヒドラターゼを活性発現させる為の形質転換体の構築

実施例2にて調製したEcoRI及びScaIにより切断された約1.3kbのDNA断片と実施例3にて調製したEcoRI及びEco47IIIにより切断された約3.3kbのDNA断片とを混合し、DNA連結反応に供した。反応産物により大腸菌HB101のコンピテントセル (東洋紡績社製) を形質転換し、形質転換体No.200を得た。

## 【0058】

500mLのバッフル付三角フラスコに40 $\mu$ g/mLの硫酸第二鉄・七水和物及び10 $\mu$ g/mLの塩化コバルト・二水和物を含む100mLのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレープにより滅菌した。この培地に終濃度が100 $\mu$ g/mL

となるようにアンピシリンを添加した後、形質転換体No. 200を一白金耳植菌し、37°C・130 rpmにて約20時間培養した。該培養終了液から遠心分離（5000G×15分間）により該形質転換体を分離した。続いて、分離した該形質転換体を50mLの生理食塩水に再懸濁した後に、再度遠心分離（5000G×15分間）により該形質転換体を分離した。

#### 【0059】

分離した該形質転換体0.1gを20mLの50mMリン酸カリウム水溶液（pH7.0）に懸濁し、これに0.5mLのアクリロニトリル又はメタアクリロニトリルを添加して30°Cで緩やかに攪拌しながら1時間反応させた。反応終了後、HPLCを用いて反応終了液の分析を行った結果、該液中には、添加したニトリル化合物（アクリロニトリル又はメタアクリロニトリル）に相当するモル量のアミド化合物（アクリルアミド又はメタクリルアミド）のみが存在しており、ニトリル化合物（アクリロニトリル又はメタクリロニトリル）及び対応する有機酸（アクリル酸又はメタクリル酸）の存在は認められなかった。すなわち、転化率及び選択性は100%であった。

#### 【0060】

また、分離した該形質転換体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製し、RNase Aを30μg加えて37°Cで1時間保温した後、フェノール抽出／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該DNAを精製し、最終的に1.0μg/μlとなるようTE溶液に溶解させた。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。その結果、該プラスミドはその配列中に配列番号6記載のニトリルヒドラターゼ活性化蛋白質をコードするORFと配列番号7記載のロドコッカスロドクロウスJ-1株由来のニトリルヒドラターゼをコードするORFとを含んでいる事が確認された。このプラスミドをpJ1H-DB1（図2）と名付けた。

#### 【実施例5】

##### 【0061】

改変前のニトリルヒドラターゼからの変異導入標的の抽出

改変方法の対象として、ロドコッカスロドクロウスJ-1株由来のニトリルヒドラターゼを例として用いた。請求項1から7に記載された変異導入の標的となるアミノ酸残基を特定する方法を例として用いて、標的の抽出を行った。請求項1・2記載の特定方法におけるアミノ酸配列のアラインメントには、日立ソフト社製のDNASISを用いた。請求項3から7記載の特定方法におけるアミノ酸配列のアラインメントに基づく立体構造のモデリングには、アクセルリス社製のモデラー乃至ホモジーを用いた。

#### 【0062】

その結果、何れの方法を用いた場合も、抽出されたアミノ酸残基の中に、該ニトリルヒドラターゼを構成する2種のポリペプチドの1つであるβサブユニットのアミノ酸配列中の48番目のTrpが含まれていた。そこで、変異導入標的として、ロドコッカスロドクロウスJ-1株由来のニトリルヒドラターゼのβサブユニットのアミノ酸配列中の48番目のTrpを例として用いる事とした。

#### 【実施例6】

##### 【0063】

改変酵素獲得を目的とした変異導入

ニトリルヒドラターゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列に変異を導入する為に、宝酒造社製の「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」を用いた部位特異的な変異導入を行った。以後、「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」を単にキットと呼ぶ。以下の実施例では、基本的にキットの原理及び操作方法に従った。

#### 【0064】

実施例4にて構築したロドコッカスロドクロウスJ-1株由来のニトリルヒドラターゼをコードするORFを含むプラスミド：pJ1H-DB1に、実施例5にて抽出した変

異導入標的である $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の48番目のTrpを他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

#### 【0065】

10ngのpJ1H-DB1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応1は、配列表の配列番号13記載のプライマー及びM13プライマー-M4（配列表の配列番号10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒・アニーリング（55℃）30秒・伸長反応（72℃）2分間の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号11に配列を記載）及びM13プライマー-RV（配列表の配列番号12に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応1と同様の操作により行った。

#### 【0066】

PCR反応1及び2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、何れも増幅DNA産物の存在が確認できた。Microcon100（宝酒造社製）を用いてそれぞれのPCR反応終了液より過剰なプライマー及びdNTPを除去した後、TEを加えて各々50μLの溶液を調製した。該TE溶液を各0.5μLずつ含む全量47.5μLのアニーリング溶液（組成はキットに記載の条件による）を調製し、熱変性処理（98℃）を10分間行った後、37℃まで60分間かけて一定の速度で冷却を行い、続いて37℃で15分間保持することによってアニーリング処理を行った。

#### 【0067】

アニーリング処理液にTakara LA Taqを0.5μL加えて72℃で3分間加熱処理を行い、ヘテロ2本鎖を完成させた。これにM13プライマー-M4（配列表の配列番号10に配列を記載）及びM13プライマー-RV（配列表の配列番号12に配列を記載）を各々50pmol加えて全量を50μLとした後、熱変性（98℃）15秒・アニーリング（55℃）30秒・伸長反応（72℃）2分間の条件を25サイクル繰り返すことによるPCR反応3を行った。

#### 【0068】

PCR反応3の反応終了液5μLを用いたアガロース電気泳動（シグマ社製タイプVII低融点アガロース使用；アガロース濃度0.8重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、約1.9kbの増幅DNA産物の存在が確認できた。続いて、アガロースゲルから約1.9kbのDNA断片のみを切り出し、該アガロース片（約0.1g）を細かく粉碎し1mLのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行って該DNA断片を精製し、最終的に10μLのTEに溶解した。

#### 【0069】

精製した約1.9kbの増幅DNA断片を制限酵素EcoRI及びHindIIIにより切断した後、この制限酵素処理液に対してフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行って該DNA断片を精製し、最終的に10μLのTEに溶解した。同様に、EcoRI及びHindIIIによりpJ1H-DB1を切断し、アガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプVII低融点アガロース使用；アガロース濃度0.7%）を行い、アガロースゲルから約2.7kbのDNA断片のみを切り出した。切りだしたアガロース片（約0.1g）を細かく粉碎し1mLのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行って該DNA断片を精製し、最終的に10μLのTEに溶解した。

#### 【0070】

この様にして得られた約1.9kbと約2.7kbのDNA断片をDNA連結反応に供した後、大腸菌HB101のコンピテントセル（東洋紡績社製）を形質転換し、複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNaseAを30μg加えて37℃で1時間保温した後、フェノール抽出／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿

によって該DNAを精製し、最終的に $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるようにTE溶液に溶解させた。続いて、AB社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

## 【0071】

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pJ1H-DB1と比較して、ロドコッカスロドクロウスJ-1株由来のニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の48番目のTrpをコードするコドンに相当する塩基配列がTrp以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

## 【0072】

下記の(表1)に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

## 【0073】

【表1】

表1

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 201	$\beta$ -48番目	Trp	Tyr	tgg	tat
No. 202	$\beta$ -48番目	Trp	Val	tgg	gtg
No. 203	$\beta$ -48番目	Trp	Ala	tgg	gcg
No. 204	$\beta$ -48番目	Trp	Gly	tgg	ggg

## 【実施例7】

## 【0074】

改変前のニトリルヒドラターゼと改変後の改変酵素との形質比較

500mLのバッフル付三角フラスコに $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ の硫酸第二鉄・七水和物及び $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の塩化コバルト・二水和物を含む100mLのLB液体培地を5つ調製し、121°C・20分間のオートクレーブにより滅菌した。各々の培地に終濃度が $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにアンピシリンを添加した。

## 【0075】

各々の培地に実施例4にて得られた形質転換体No. 200と実施例6にて得られた形質転換体No. 201から204の計5種類の形質転換体を1種類ずつ各々5つの培地に一白金耳植菌した。37°C・130rpmにて約20時間培養した後、各々の培養終了液から遠心分離( $5000G \times 15$ 分間)により各形質転換体を分離した。続いて、分離した各形質転換体を50mLの生理食塩水に各々再懸濁した後に、再度遠心分離( $5000G \times 15$ 分間)により各形質転換体を分離した。

## 【0076】

各形質転換体0.1gを20mLの50mMリン酸カリウム水溶液(pH7.0)に各々懸濁した後、10mL×2本に分注した。従って各形質転換体当たり2本、合計10本の懸濁液が準備された。各形質転換体の懸濁液の1本には1mLのアクリロニトリルを、もう1本にはメタアクリロニトリルを添加して、30°Cで緩やかに攪拌しながら10分間反応させた。

## 【0077】

反応終了後、HPLCを用いて各反応終了液の分析を行った結果、各液中には反応しきれなかった基質であるニトリル化合物(アクリロニトリル又はメタクリロニトリル)と、

反応によって生じた生成物である対応するアミド化合物（アクリルアミド又はメタクリルアミド）とが存在していた。尚、対応する有機酸（アクリル酸又はメタクリル酸）の存在は認められなかった。

## 【0078】

各形質転換体ごとに、アクリロニトリルを基質とする反応で生成したアクリルアミドとメタクリロニトリルを基質とする反応で生成したメタクリルアミドとのモル比を比較した結果、下記の（表2）に示す様な違いが観察された。アクリロニトリルとメタクリロニトリルを比較した場合、メタクリロニトリルの方が嵩高いニトリル化合物である事から、この結果は、より嵩高い基質を水和し易くなつた改変酵素が得られた事を示している。

## 【0079】

【表2】

表2

番号	$\beta$ -48番目 の アミノ酸（塩基配列）	水和活性比（相対比）	
		[メタクリロニトリルを基質とした場合] ÷ [アクリロニトリルを基質とした場合]	
No. 200	T r p (t g g)	0. 41	(100%)
No. 201	T y r (t a t)	0. 87	(211%)
No. 202	V a l (g t g)	0. 79	(192%)
No. 203	A l a (g c g)	0. 67	(163%)
No. 204	G l y (g g g)	0. 82	(198%)

## 【産業上の利用可能性】

## 【0080】

本発明は、生体触媒を用いた物質生産の分野に於いて有用である。その例としては、ニトリルヒドラターゼと呼称される酵素乃至該酵素を活性発現する生体を触媒とするニトリル化合物の水和によって対応するアミド化合物に転換する物質生産を挙げる事が出来る。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0081】

【図1】MT10822より抽出したプラスミドpPT-DB1の制限酵素切断点地図である。（実施例3）

【図2】ロドコッカス ロドクロウス J-1株由来のニトリルヒドラターゼを活性発現させる為に構築したプラスミドpJ1H-DB1の制限酵素切断点地図である。（実施例4）

## 【符号の説明】

## 【0082】

b1a :  $\beta$ -ラクタマーゼをコードするORFを示す。

C01E1-ori : C01E1系の複製開始部位を示す。

lacZ : pUC18由来のラクトースオペロンのプロモーターおよびオペレーター領域を示す。

NH $\alpha$  : シュードノカルディア サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットをコードするORFを示す。

NH $\beta$  : シュードノカルディア サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニ

ットをコードするORFを示す。

P16：シュードノカルディア サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼの活性化に関する事を特徴とする蛋白質をコードするORFを示す。

n h h A：ロドコッカス ロドクロウス J-1株由来のニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットをコードするORFを示す。

n h h B：ロドコッカス ロドクロウス J-1株由来のニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットをコードするORFを示す。

### 【配列表】

## **SEQUENCE LISTING**

<110> MITSUI CHEMICALS INC.

<120> A method for change of an enzyme having nitrile-hydratase activity  
<130> P0002692

<160> 13

<210> 1

<211> 205

<212> PRT

<213> Pseudonocardia thermophila

<220>

<221> source

<222> 1..205

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"  
/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..205

<223> /gene="nitrile hydratase alpha subunit"  
/product="nitrile hydratase alpha subunit"

<400> 1

Met Thr Glu Asn Ile Leu Arg Lys Ser Asp Glu Glu Ile Gln Lys Glu  
5 10 15

Ile Thr Ala Arg Val Lys Ala Leu Glu Ser Met Leu Ile Glu Gln Gly  
 20                    25                    30

Ile Leu Thr Thr Ser Met Ile Asp Arg Met Ala Glu Ile Tyr Glu Asn  
35 40 45

Glu Val Gly Pro His Leu Gly Ala Lys Val Val Val Lys Ala Trp Thr  
 50                    55                    60

Asp Pro Glu Phe Lys Lys Arg Leu Leu Ala Asp Gly Thr Glu Ala Cys  
65 70 75 80

Lys Glu Leu Gly Ile Gly Gly Leu Gln Gly Glu Asp Met Met Trp Val  
 85                    90                    95

Glu Asn Thr Asp Glu Val His His Val Val Val Cys Thr Leu Cys Ser  
 100 105 110

Cys Tyr Pro Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro Pro Asn Trp Phe Lys Glu  
 115                    120                    125

Pro Gln Tyr Arg Ser Arg Val Val Arg Glu Pro Arg Gln Leu Leu Lys  
130 135 140

Glu Glu Phe Gly Phe Glu Val Pro Pro Ser Lys Glu Ile Lys Val Trp  
 145 150 155 160

Asp Ser Ser Ser Glu Met Arg Phe Val Val Leu Pro Gln Arg Pro Ala  
 165 170 175

Gly Thr Asp Gly Trp Ser Glu Glu Leu Ala Thr Leu Val Thr Arg  
 180 185 190

Glu Ser Met Ile Gly Val Glu Pro Ala Lys Ala Val Ala  
 195 200 205

<210> 2

<211> 223

<212> PRT

<213> Pseudonocardia thermophila

<220>

<221> source

<222> 1..223

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"  
 /strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..223

<223> /gene="nitrile hydratase beta subunit"  
 /product="nitrile hydratase beta subunit"

<400> 2

Met Asn Gly Val Tyr Asp Val Gly Gly Thr Asp Gly Leu Gly Pro Ile  
 5 10 15

Asn Arg Pro Ala Asp Glu Pro Val Phe Arg Ala Glu Trp Glu Lys Val  
 20 25 30

Ala Phe Ala Met Phe Pro Ala Thr Phe Arg Ala Gly Phe Met Gly Leu  
 35 40 45

Asp Glu Phe Arg Phe Gly Ile Glu Gln Met Asn Pro Ala Glu Tyr Leu  
 50 55 60

Glu Ser Pro Tyr Tyr Trp His Trp Ile Arg Thr Tyr Ile His His Gly  
 65 70 75 80

Val Arg Thr Gly Lys Ile Asp Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Thr Gln  
 85 90 95

Tyr Tyr Arg Glu Asn Pro Asp Ala Pro Leu Pro Glu His Glu Gln Lys

100

105

110

Pro Glu Leu Ile Glu Phe Val Asn Gln Ala Val Tyr Gly Gly Leu Pro  
 115 120 125

Ala Ser Arg Glu Val Asp Arg Pro Pro Lys Phe Lys Glu Gly Asp Val  
 130 135 140

Val Arg Phe Ser Thr Ala Ser Pro Lys Gly His Ala Arg Arg Ala Arg  
 145 150 155 160

Tyr Val Arg Gly Lys Thr Gly Thr Val Val Lys His His Gly Ala Tyr  
 165 170 175

Ile Tyr Pro Asp Thr Ala Gly Asn Gly Leu Gly Glu Cys Pro Glu His  
 180 185 190

Leu Tyr Thr Val Arg Phe Thr Ala Gln Glu Leu Trp Gly Pro Glu Gly  
 195 200 205

Asp Pro Asn Ser Ser Val Tyr Tyr Asp Cys Trp Glu Pro Tyr Ile Glu  
 210 215 220

Leu Val Asp Thr Lys Ala Ala Ala  
 225 230 233

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 618

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Pseudonocardia thermophila

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; source

&lt;222&gt; 1..618

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"  
 /strain="JCM3095"

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; 1..618

<223> /gene="nitrile hydratase alpha subunit"  
 /product="nitrile hydratase alpha subunit"

&lt;400&gt; 3

atgaccgaga acatcctgcg caagtcggac gaggagatcc agaaggagat cacggcgcgg 60

gtcaaggccc tggagtcgat gctcatcgaa cagggcatcc tcaccacgtc gatgatcgac 120

cgatggccg agatctacga gaacgaggta ggccgcacc tcggcgcgaa ggtcgctgt 180

aaggcctgga ccgaccggaa gttcaagaag cgtctgctcg ccgacggcac cgaggcctgc 240  
 aaggagctcg gcatcgccgg cctgcagggc gaggacatga tgtgggtgga gaacaccgac 300  
 gaggtccacc acgtcgctgt gtgcacgctc tgctcctgct acccgtaggc ggtgctgggg 360  
 ctgccgcccga actggtaaa ggagccgcag taccgctccc gcgtggtgcg tgagccccgg 420  
 cagctgctca aggaggagtt cggcttcgag gtcccgccga gcaaggagat caaggtctgg 480  
 gactccagct ccgagatgct cttcgctc tcggcgacg gccccgggg caccgacggg 540  
 tggagcgagg aggagctcgc caccctcgac acccgcgagt cgatgatcgg cgtcgaaccg 600  
 gcgaaggcgg tcgcgtga 618

<210> 4  
 <211> 702  
 <212> DNA  
 <213> Pseudonocardia thermophila

<220>  
 <221> sourse  
 <222> 1..702  
 <223> /organism="Pseudonocardia thermophila"  
 /strain="JCM3095"

<220>  
 <221> CDS  
 <222> 1..702  
 <223> /gene="nitrile hydratase beta subunit"  
 /product="nitrile hydratase beta subunit"

<400> 4  
 atgaacggcg tgtacgacgt cggcggcacc gatgggctgg gcccgatcaa ccggcccg 60  
 gacgaaccgg tcttcgcgc ctagtggag aaggtcgct tcgcgatgtt cccggcgacg 120  
 ttccggccg gttcatggg cctggacgag ttccgggtcg gcatcgagca gatgaacccg 180  
 gccgagttacc tcgagtcgcc gtactactgg cactggatcc gcacctacat ccaccacggc 240  
 gtccgcaccc gcaagatcga tctcgaggag ctggagcgcc gcacgcagta ctaccggag 300  
 aaccccgacg ccccgctgcc cgagcacgag cagaagccgg agttgatcga gttcgtaac 360  
 caggccgtct acggcgggct gcccgcaga cgggaggtcg accgaccgac caagttcaag 420  
 gagggcgacg tggtgcggtt ctccaccgcg agcccgaaagg gccacgccccg gcgcgcgcgg 480

tacgtgcgca gcaagaccgg gacggtggtc aagcaccacg gcgcgtacat ctacccggac 540

accgccggca acggcctggg cgagtgc(cc) gagcacctct acaccgtccg cttcacggcc 600

caggagctgt gggggccgga aggggacccg aactccagcg tctactacga ctgctggag 660

ccctacatcg agctcgta cacgaaggcg gccgcggcat ga 702

<210> 5

<211> 144

<212> PRT

<213> Pseudonocardia thermophila

<220>

<221> sourse

<222> 1..144

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"

/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..144

<223> /gene="gene encoding protein participation in the activation of nitrile hydratase"

/product="protein participation in the activation of nitrile hydratase"

<220>

<221> INT#MET

<222> 1

<400> 5

Met Ser Ala Glu Ala Lys Val Arg Leu Lys His Cys Pro Thr Ala Glu  
 1 5 10 15

Asp Arg Ala Ala Ala Asp Ala Leu Leu Ala Gln Leu Pro Gly Gly Asp  
 20 25 30

Arg Ala Leu Asp Arg Gly Phe Asp Glu Pro Trp Gln Leu Arg Ala Phe  
 35 40 45

Ala Leu Ala Val Ala Ala Cys Arg Ala Gly Arg Phe Glu Trp Lys Gln  
 50 55 60

Leu Gln Gln Ala Leu Ile Ser Ser Ile Gly Glu Trp Glu Arg Thr His  
 65 70 75 80

Asp Leu Asp Asp Pro Ser Trp Ser Tyr Tyr Glu His Phe Val Ala Ala  
 85 90 95

Leu Glu Ser Val Leu Gly Glu Gly Ile Val Glu Pro Glu Ala Leu  
 100 105 110

Asp Glu Arg Thr Ala Glu Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Lys Asp His  
 115 120 125

His Gly Pro His Leu Glu Pro Val Ala Val His Pro Ala Val Arg Ser  
 130 135 140

<210> 6

<211> 435

<212> DNA

<213> Pseudonocardia thermophila

<220>

<221> source

<222> 1..435

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"

/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..435

<223> /gene="gene encoding protein participation in the activation of nitrile hydratase"

/product="protein participation in the activation of nitrile hydratase"

<220>

<221> init\_codon

<222> 1..3

<220>

<221> g or a

<222> 1..1

<400> 6

rtgagcgccg aggcgaaggt ccgcctgaag cactgccccca cggccgagga ccggggcggcg 60

gccgacgcgc tgctcgcgca gctgcccggc ggccgaccgcg cgctcgaccg cggcttcgac 120

gagccgtggc agctgcgggc gttcgcgctg gcggtcgcgg cgtcagggc gggccggttc 180

gagtggaaagc agctgcagca ggcgcgtgatc tcctcgatcg gggagtggga ggcgcacccac 240

gatctcgacg atccgagctg gtcctactac gagcacttcg tcgcccgcgt ggaatccgtg 300

ctcggcgagg aagggatcgt cgagccggag ggcgcgtggacg agcgcaccgc ggaggtcttg 360

gccaacccgc cgaacaagga tcaccatggc ccgcattctgg agcccgctgc ggtccacccg 420

gccgtgcggc cctga

435

<210> 7  
<211> 1315  
<212> DNA  
<213> Rhodococcus rhodochrous

<220>  
<221> sourse  
<222> 1.. 1315  
<223> /organism="Rhodococcus rhodochrous"  
/strain="J1(FERM BP-1478)"

<220>  
<221> CDS  
<222> 1..690  
<223> /gene="nitrile hydratase beta subunit"  
/product="nitrile hydratase beta subunit"

<220>  
<221> CDS  
<222> 704..1315  
<223> /gene="nitrile hydratase alpha subunit"  
/product="nitrile hydratase alpha subunit"

<400> 7  
atg gat ggt atc cac gac aca ggc ggc atg acc gga tac gga ccg gtc 48  
Met Asp Gly Ile His Asp Thr Gly Gly Met Thr Gly Tyr Gly Pro Val  
1 5 10 15

ccc tat cag aag gac gag ccc ttc ttc cac tac gag tgg gag ggt cg 96  
Pro Tyr Gln Lys Asp Glu Pro Phe His Tyr Glu Trp Glu Gly Arg  
20 25 30

acc ctg tca att ctg act tgg atg cat ctc aag ggc ata tcg tgg tgg 144  
Thr Leu Ser Ile Leu Thr Trp Met His Leu Lys Gly Ile Ser Trp Trp  
35 40 45

gac aag tcg cg 50 55 60 192  
Asp Lys Ser Arg Phe Phe Arg Glu Ser Met Gly Asn Glu Asn Tyr Val

aac gag att cgc aac tcg tac tac acc cac tgg ctg agt gcg gca gaa 240  
Asn Glu Ile Arg Asn Ser Tyr Tyr His Trp Leu Ser Ala Ala Glu  
65 70 75 80

cgt atc ctc gtc gcc gac aag atc atc acc gaa gaa gag cga aag cac 288  
Arg Ile Leu Val Ala Asp Lys Ile Ile Thr Glu Glu Glu Arg Lys His  
85 90 95

cgt gtg caa gag atc ctt gag ggt cg 336  
tac acg gac agg aag ccg tcg

Arg Val Gln Glu Ile Leu Glu Gly Arg Tyr Thr Asp Arg Lys Pro Ser  
 100 105 110

cgg aag ttc gat ccg gcc cag atc gag aag gcg atc gaa cggtt cac 384  
 Arg Lys Phe Asp Pro Ala Gln Ile Glu Lys Ala Ile Glu Arg Leu His  
 115 120 125

gag ccc cac tcc cta gcgcgttcca gga gcgcgcg agtttc tct ctgc 432  
 Glu Pro His Ser Leu Ala Leu Pro Gly Ala Glu Pro Ser Phe Ser Leu  
 130 135 140

ggtaacaaaatgtcggaaacaaatcgggaaatcgatcgttgcacaca 480  
 Gly Asp Lys Ile Lys Val Lys Ser Met Asn Pro Leu Gly His Thr Arg  
 145 150 155 160

tgc ccg aaa tat gtccggaaatcgggaaatcgatcgttgcacaca 528  
 Cys Pro Lys Tyr Val Arg Asn Lys Ile Gly Glu Ile Val Ala Tyr His  
 165 170 175

ggc tgc cag atc tat ccc gag agc agc tcc gcc ggc ctc ggc gac gat 576  
 Gly Cys Gln Ile Tyr Pro Glu Ser Ser Ala Gly Leu Gly Asp Asp  
 180 185 190

cct cgc ccg ctc tac acg gtc gcgttttccgcccagaaatcgatcgttgc 624  
 Pro Arg Pro Leu Tyr Thr Val Ala Phe Ser Ala Gln Glu Leu Trp Gly  
 195 200 205

gac gac gga aac ggg aaa gac gta gtgcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtc 672  
 Asp Asp Gly Asn Gly Lys Asp Val Val Cys Val Asp Leu Trp Glu Pro  
 210 215 220

tac ctg atc tct gcgttgaaatcgatagtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtcgtc 720  
 Tyr Leu Ile Ser Ala \*\*\* Met Ser Glu His Val Asn  
 225 229 1 5

aag tac acg gag tac gag gca cgt acc aag gcgcgttgcaccgttgc 768  
 Lys Tyr Glu Tyr Glu Ala Arg Thr Lys Ala Ile Glu Thr Leu Leu  
 10 15 20

tac gag cga ggg ctc atc acg ccc gcc gcgcgtcgtcgtcgtcgtcgtc 816  
 Tyr Glu Arg Gly Leu Ile Thr Pro Ala Ala Val Asp Arg Val Val Ser  
 25 30 35

tac tac gag aac gag atc ggc ccg atg ggc ggt gcc aag gtc gtg gcc 864  
 Tyr Tyr Glu Asn Glu Ile Gly Pro Met Gly Gly Ala Lys Val Val Ala  
 40 45 50

aag tcc tgg gtg gac cct gag tac cgc aag tgg ctc gaa gag gac gcg 912  
 Lys Ser Trp Val Asp Pro Glu Tyr Arg Lys Trp Leu Glu Glu Asp Ala  
 55 60 65 70

acg gcc gcg atg gcg tca ttg ggc tat gcc ggt gag cag gca cac caa Thr Ala Ala Met Ala Ser Leu Gly Tyr Ala Gly Glu Gln Ala His Gln 75                   80                   85	960
att tcg gcg gtc ttc aac gac tcc caa acg cat cac gtg gtg gtg tgc Ile Ser Ala Val Phe Asn Asp Ser Gln Thr His His Val Val Val Cys 90                   95                   100	1008
act ctg tgt tcg tat ccg tgg ccg gtg ctt ggt ctc ccg ccc gcc Thr Leu Cys Ser Cys Tyr Pro Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro Pro Ala 105               110               115	1056
tgg tac aag agc atg gag tac cgg tcc cga gtg gta gcg gac cct cgt Trp Tyr Lys Ser Met Glu Tyr Arg Ser Arg Val Val Ala Asp Pro Arg 120               125               130	1104
gga gtg ctc aag cgc gat ttc ggt ttc gac atc ccc gat gag gtg gag Gly Val Leu Lys Arg Asp Phe Gly Phe Asp Ile Pro Asp Glu Val Glu 135               140               145               150	1152
gtc agg gtt tgg gac agc agc tcc gaa atc cgc tac atc gtc atc ccg Val Arg Val Trp Asp Ser Ser Ser Glu Ile Arg Tyr Ile Val Ile Pro 155               160               165	1200
gaa cgg ccg gcc ggc acc gac ggt tgg tcc gag gag gag ctg acg aag Glu Arg Pro Ala Gly Thr Asp Gly Trp Ser Glu Glu Glu Leu Thr Lys 170               175               180	1248
ctg gtg agc cgg gac tcg atg atc ggt gtc agt aat gcg ctc aca ccg Leu Val Ser Arg Asp Ser Met Ile Gly Val Ser Asn Ala Leu Thr Pro 185               190               195	1296
cag gaa gtg atc gta tga Gln Glu Val Ile Val *** 200               203	1315
<210> 8	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer	
<400> 8	
ccggaattcg aaaggaatga ggaaatgga	29
<210> 9	
<211> 28	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 9

aaaaagtact catacgatca cttcctgc

28

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 10

gttttcccag tcacgac

17

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 11

ggccagtgcc tagcttacat

20

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 12

caggaaacag ctatgac

17

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 14..16

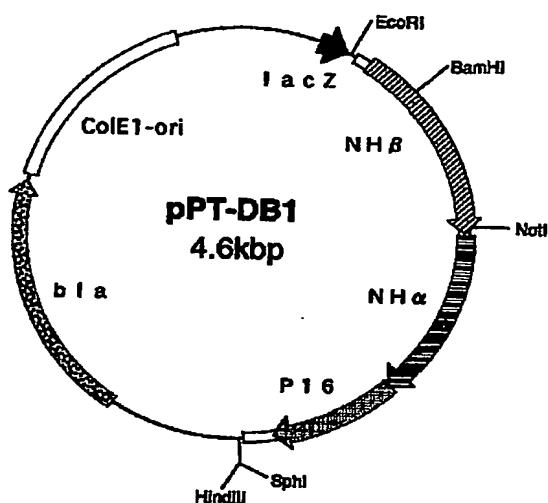
<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 13

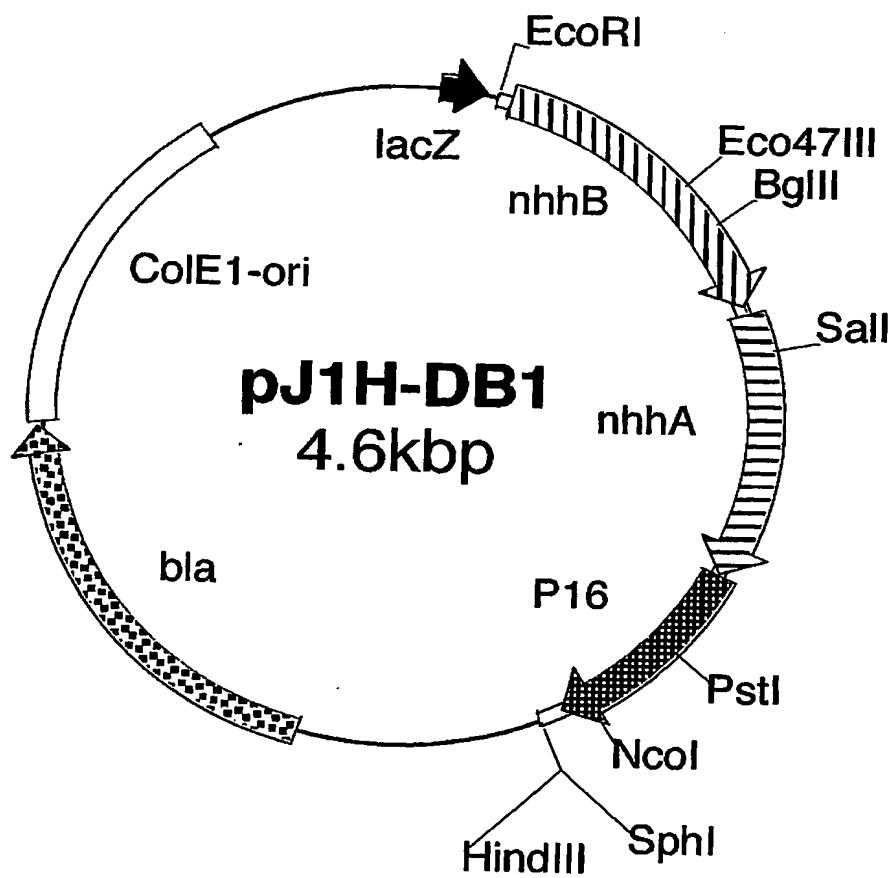
gggcatatcg tggnnngaca agtcgcggt

28

【書類名】図面  
【図 1】



【図 2】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の改変方法を提供する。具体的には、ニトリルヒドラターゼの立体構造に変化を及ぼす変異をニトリルヒドラターゼ遺伝子に導入する事によって、ニトリルヒドラターゼ本来の活性は損なう事無く、活性等の該酵素の諸性質を変化させる事を含む改変方法を提供する。更に、改変方法によって得られた改変酵素、該改変酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含むプラスミド、細胞株、該細胞株を用いてニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する方法を提供する。

【解決手段】改変の対象となる領域をニトリルヒドラターゼ中の立体構造／アミノ酸配列中に特定し、該領域を形成するアミノ酸残基に相当するアミノ酸配列中のアミノ酸に置換・挿入・削除等の変更を加える事によってニトリルヒドラターゼを改変する。また、該変更によって得られた改変酵素遺伝子の塩基配列を決定し、該遺伝子を含むプラスミド、該遺伝子乃至該プラスミドにより形質転換された細胞株を作製し、該細胞株を用いた該酵素の產生や該細胞株を培養して得られる培養液・細胞・細胞処理物を用いたニトリル化合物からの対応アミド化合物の製造方法。

【選択図】図2

特願 2003-379280

ページ： 1/E

出願人履歴情報

識別番号 [000005887]

1. 変更年月日 2003年11月 4日

[変更理由] 住所変更

住所 東京都港区東新橋一丁目5番2号  
氏名 三井化学株式会社